

RO/KR 08.03.2004

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

RECEIVED

16 MAR 2004

WIPO PCT

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

출원번호 :
Application Number

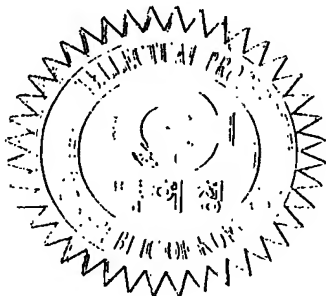
10-2003-0001392

출원년월일 :
Date of Application

2003년 01월 09일
JAN 09, 2003

출원인 :
Applicant(s)

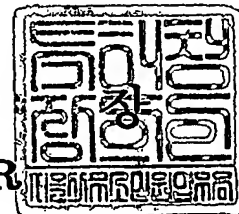
학교법인 포항공과대학교
POSTECH FOUNDATION



2003 년 04 월 22 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.01.09
【발명의 명칭】	포스포라미다이트 화합물
【발명의 영문명칭】	PHOSPHORAMIDITE COMPOUNDS
【출원인】	
【명칭】	학교법인 포항공과대학교
【출원인코드】	2-1999-900096-8
【대리인】	
【성명】	오규환
【대리인코드】	9-1998-000435-1
【포괄위임등록번호】	2000-016245-0
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2000-016240-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김병현
【성명의 영문표기】	KIM,Byeang Hyeon
【주민등록번호】	550228-1120814
【우편번호】	790-390
【주소】	경상북도 포항시 남구 지곡동 756 교수아파트 6-601
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김수정
【성명의 영문표기】	KIM,Su Jeong
【주민등록번호】	710829-1110921
【우편번호】	790-784
【주소】	경상북도 포항시 남구 효자동 산 31번지 포항공과대학교 기숙사 11-3 10
【국적】	KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

방은경

【성명의 영문표기】

BANG, Eun-Kyoung

【주민등록번호】

801223-2019039

【우편번호】

790-390

【주소】

경상북도 포항시 남구 지곡동 포항공과대학교 기숙사 여3동 305호

【국적】

KR

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**【서열개수】**

14

【서열목록의 전자파일】

첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 다
리인
환 (인) 대리인
장성구 (인)

【수수료】**【기본출원료】**

20 면 29,000 원

【가산출원료】

22 면 22,000 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

0 항 0 원

【합계】

51,000 원

【감면사유】

학교

【감면후 수수료】

25,500 원

【첨부서류】

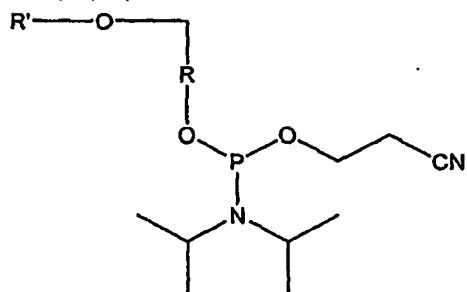
1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 하기 화학식 1을 갖는 새로운 포스포라미다이트(phosphoramidite) 화합물에 관한 것으로, 본 발명의 포스포라미다이트는 의약 및 생명과학 분야에서 다양한 목적의 올리고데옥시리보뉴클레오타이드를 합성하는데 사용할 수 있다:

【화학식 1】



상기 식에서, R은 1,3-부탄디올, 펜타에리트리톨 또는 리토콜 알콜이고,

R'는 DMTr, Lev, TBDMS 또는 벤질기이다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

포스포라미다이트 화합물{PHOSPHORAMIDITE COMPOUNDS}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 합성 올리고머의 용융온도를 나타낸 그래프이고,
도 2 및 3은 합성 올리고머의 CD 스펙트럼을 나타내는 것이고,
도 4는 정제된 올리고머의 HPLC 크로마토그래피를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <4> 본 발명은 새로운 포스포라미다이트(phosphoramidite) 화합물에 관한 것이다.
- <5> DNA는 모든 생물의 유전정보를 저장하고 생명을 유지하기 위한 가장 중요한 물질이다. 이러한 DNA에 대한 연구는 1953년 왓슨과 크릭에 의해 이중 나선 구조가 밝혀진 이래로 가속화되어 왔다.
- <6> 유전학 분야에서는 DNA의 유전정보가 전달되어 발현되는 메커니즘을 규명하였고, 그 후 화학적인 방법을 통해 DNA를 합성하기 위한 다양한 방법이 고안되었으며(Agrawal, S., *Synthesis and Properties*, Humana Press: Totowa, Chapter 1-4, (1993)), 이에 따

라 개발된 합성기술을 기반으로 하여 DNA를 약으로 사용하여 질병을 극복하고자 하는 연구가 시도되고 있다(Kool, E. T., *Chem. Rev.*, 97; 1473(1997)).

<7> 특히 최근에는 축적된 DNA 자체의 구조나 성질 등의 지식을 바탕으로 DNA를 적극적으로 변형하여 의학 및 생명과학 분야에 적용하려는 시도가 많이 이루어지고 있으며, 구조적으로 흥미로운 변형 핵산들도 많이 합성된 바 있다(Newcome, G. R., et al., *Dendritic Molecules: Concepts, Synthesis, Perspectives*. VCH Publishers, New York, 116(1996); Shchepinov, M. S. et al., *Nucleic Acids Res.*, 25, 4447-4454(1997); Shchepinov, M. S. et al., *Nucleic Acids Res.*, 27, 3035-3041(1999); 및 Winfree, E. et al., *Nature*, 394, 539-544(1998)).

<8> 또한 DNA 고유의 특성 중 하나인 염기들의 상보적 결합을 이용하여 나노선의 합성, 금 나노 입자에 결합하여 진단물질로 이용, 분자 모터의 합성 등 다양한 분야에 도입하고자 하는 시도가 이루어지고 있으며(Braun, E. et al., *Nature*, 391; 775-778(1998); Whitesides, G. M. et al., *Science*, 254; 1312-1319(1991); Mirkin, C. A. et al., *Nature*, 382; 607-609(1996); Elghanian, R. et al., *Science*, 277, 1078-1081(1997); Alivisatos, A. P. et al., *Nature*, 382, 609-611(1996); Zhang, P. et al., *Angew. Chem.*, 40, 402(2001); Li, J. et al., *Nano Lett.*, 2; 315-318(2002)), 이러한 다양한 분야로의 접목을 위해 천연 DNA에 사용 목적에 적합한 새로운 기능의 도입이 요구되고 있다.

<9> 이에 본 발명자들은 여러 분야에 적용할 수 있는 DNA 변형체의 제조를 위한 단위체를 개발하기 위해 계속 연구한 결과, 새로운 포스포라미다이트 화합물을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

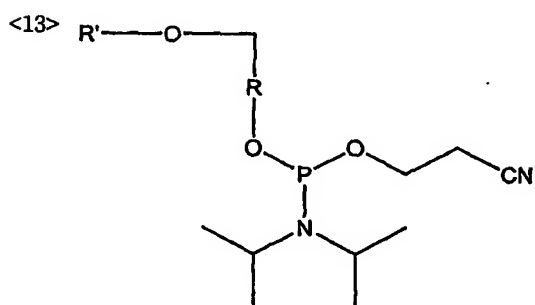
【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<10> 본 발명의 목적은 새로운 포스포라미다이트 화합물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<11> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 화학식 1의 포스포라미다이트 화합물을 제공한다:

<12> 화학식 1



<14> 상기 식에서, R은 1,3-부탄디올, 펜타에리트리톨 또는 리토콜 알콜이고,

<15> R'는 DMTr, Lev, TBDMS 또는 벤질기이다.

<16> 화학식 1의 포스포라미다이트 화합물 중 바람직한 것은 (R)-(-)-1-O-DMT-3-O-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-1,3-부탄디올,
(S)-(+)-1-O-DMT-3-O-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-1,3-부탄디

을), (O-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-벤질글리콜레이트),
 O-DMTr-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-리토콜 알콜, O-트리
 -DMTr-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-펜타에리트리톨,
 O-DMTr-O-di-Lev-O-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-펜타에리트리
 톨, O-DMTr-O-Lev-O-TBDMS-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-펜타에
 리트리톨이다.

<17> 본 발명의 포스포라미다이트 화합물들은 1) (R)-(-) 또는 (S)-(+)-1,3-부탄디올을
 이용하는 방법; 2) 벤질 글리콜레이트를 이용하는 방법; 3) 리토콜산(lithocolic acid)
 을 이용하는 방법; 및 4) 분지된(branched) ODNs를 합성하기 위한 포스포라미다이트를
 합성하는 방법 등에 의해 제조할 수 있다.

<18> 이하, 본 발명을 좀더 상세하게 설명한다.

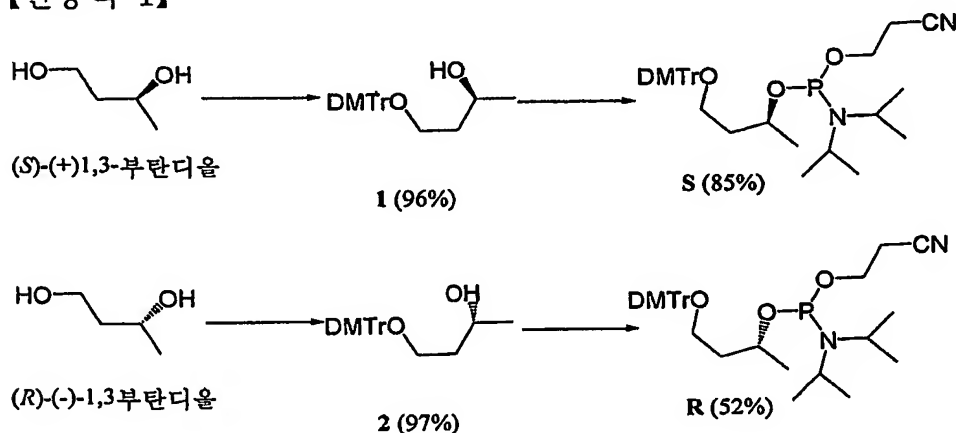
<19> 1) (R)-(-) 또는 (S)-(+)-1,3-부탄디올을 이용한 광학적으로 순수한 포스포라미다
 이트의 합성(반응식 1)

<20> 1,3-부탄디올은 뉴클레오시드에서 염기와 당고리를 제거한 가장 간단한 구조의 화
 합물로서 이 화합물의 두 거울상 이성질체인 (R)-(-) 또는 (S)-(+)-1,3-부탄디올의 1차
 알코올을 DMTr (Dimethoxy trityl)기로 보호하고(화합물 1 및 2), 2차 알코올에 포스포
 라미다이트기를 도입하여 두 가지의 포스포라미다이트 이성질체(화합물 S 및 R)를 수득
 할 수 있다.

<21> 수득된 두 가지 이성질체에서 작은 단위인 키랄 중심체의 차이가 전체 올리

고뉴클레오타이드의 구조에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 각 포스포라미다이트 이성질체를 올리고뉴클레오타이드 내부에 삽입하여 각각의 용융온도(melting temperature) 및 CD (Circular Dichroism)를 측정하여 분석하였다. 그 결과, R 및 S 이성질체의 구조적 차이가 전체 올리고뉴클레오타이드의 구조에 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 화합물 S 및 R은 올리고뉴클레오타이드와 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 연결자(linker)로 이용이 가능할 것으로 기대된다.

<22> 【반응식 1】

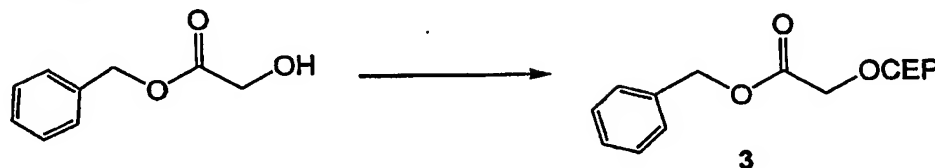


<23> 2) 벤질 글리콜레이트를 이용한 포스포라미다이트의 합성(반응식 2)

<24> 벤질 글리콜레이트의 끝에 포스포라미다이트 기를 도입하여 알콜기와 쉽게 결합시킬 수 있는 단위체를 제조할 수 있으며, 구체적으로, THF를 용매로 사용하고 DIPEA(*N,N*-diisopropylethylamine) 존재 하에 벤질 글리콜레이트와 클로로-(2-시아노에틸)-*N,N*-디이소프로필아미노포스핀을 결합시킴으로써 포스포라미다이트(화합물 3)를 수득할 수 있다.

<25> 올리고뉴클레오타이드 합성의 기본 프로토콜에 따르면 화합물 3에서 벤질기가 제거됨으로써 산기가 도입될 수 있으므로, 수득된 포스포라미다이트는 합성기를 이용하여 산 작용기를 도입하고자 할 때 사용할 수 있다.

<26> 【반응식 2】



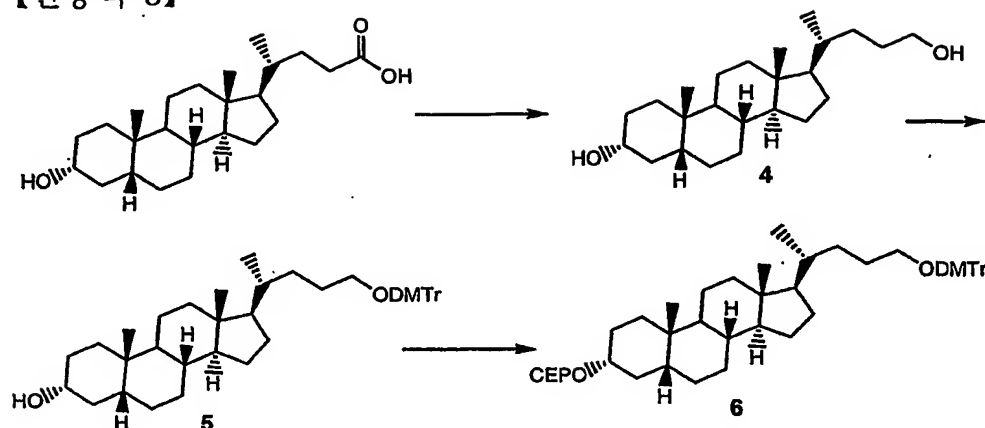
<27> 3) 리토콜산을 이용한 포스포라미다이트의 합성

<28> 리토콜산은 콜레스테롤 유사체로서, 2차 알코올기와 1차 카르복시 산기를 갖는 화합물이다. 콜레스테롤 분자는 인체의 기능을 정상으로 유지하는데 필수적으로 필요한 지방질로서 세포막의 구성 성분이기도 하며 소수성이어서 세포막을 잘 통과할 수 있다. 따라서, DNA를 약으로 사용하려는 시도의 큰 문제점 중 하나인 세포 투과성을 향상시키기 위해 콜레스테롤 유사체를 안티센스(antisense)나 항-유전자(antigene) 치료법에 응용하려는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드(oligodeoxyribonucleotide; ODN)에 도입시킨다면 세포막 투과성을 높임으로써 그 응용성을 높일 수 있다.

<29> 이 포스포라미다이트는 리토콜산의 카르복시 산기를 환원하여 1차 알코올(화합물 4)을 만든 후 DMTr 기를 도입하고(화합물 5), 나머지 2차 알코올에 포스포아미다이트기를 도입함(화합물 6)으로써 합성할 수 있다.

<30> 수득된 화합물은 DMTr기와 포스포라미다이트기를 가지므로 DNA의 내부에 삽입이 가능한 단위체로 세포 투과성의 향상이라는 장점과 더불어 DNA의 2차 및 3차 구조 형성에 영향을 미칠 것으로 기대된다.

<31> 【반응식 3】



<32> 4) 펜타에리트리톨을 이용한 포스포라미다이트의 합성(반응식 4)

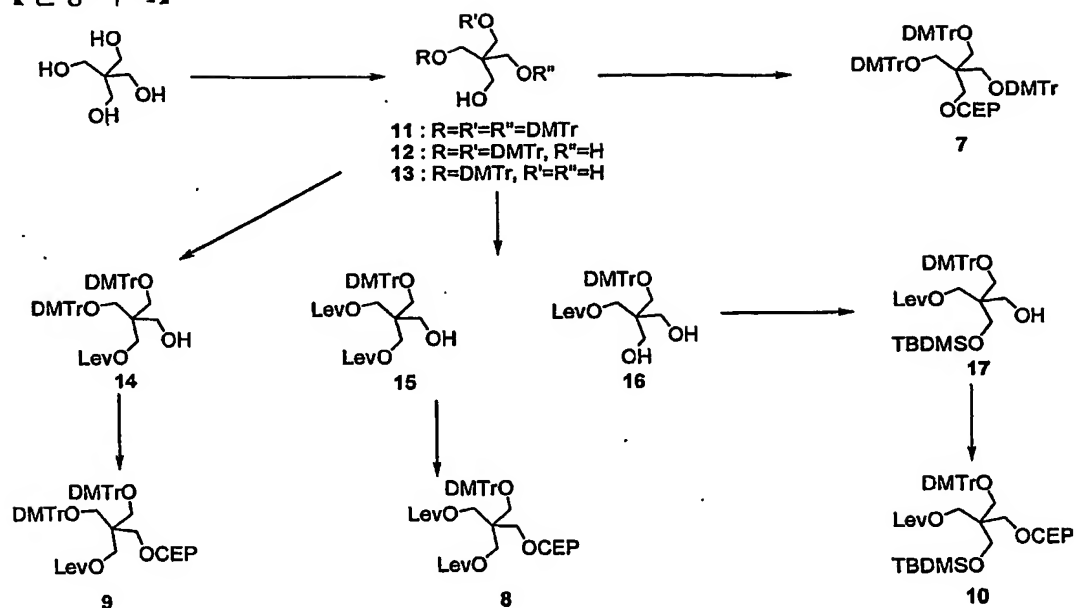
<33> 분지 DNA (bdna)는 기존의 ODN이 하나의 긴 가닥으로 되어 있는 것과는 달리 여러 개의 ODN 가닥이 하나의 분자를 이루고 있다. bdna는 이미 다양한 목적으로 연구가 진행되고 있는데, 이는 자연적으로 발생하는 분지 RNA의 구조와 역할을 규명하기 위해서 및 트리플렉스(triplex)를 안정화시키는 꺾인 형태의 올리고머를 디자인하기 위해 연구되거나(Hudson, R. H.; Uddin, A. H.; Damha, M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 12470-12477(1995)), 특정 DNA 서열을 찾아내는 과정에서 신호증폭의 도구로 연구되어 왔다(Collins, M. L. et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 15, 2979-2984(1997); 및 Horn, T, et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 23, 4835-4849(1997)).

<34> bdna를 반복적으로 연결하여 고-분지된(hyperbranched) 폴리머나 덴드리머를 합성하는 연구도 진행되고 있다. 덴드리머는 구조적으로 아름답고 특징적인 성질을 가지며, 말단 부위에 다양한 기능기를 도입하여 원하는 기능을 하도록 할 수 있을 뿐만 아니라 중심 부분과 특정 분자와 상호작용을 유도할 수도 있는 등 응용의 폭이 넓어 다양하게

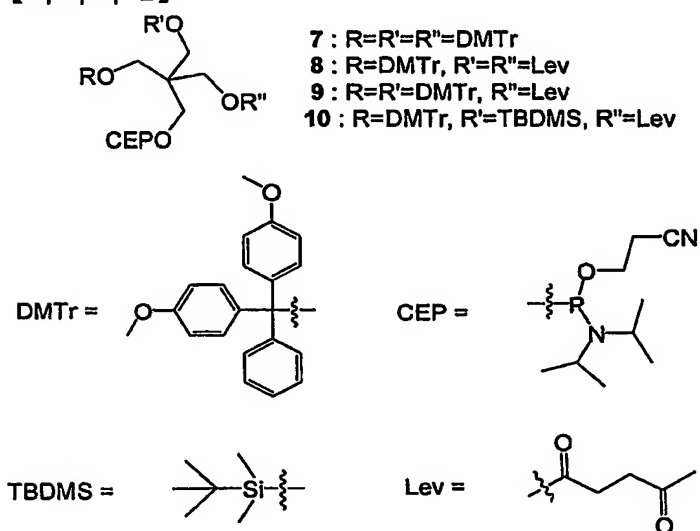
연구되고 있는 분야이다(Newkome, G. R. et al., *Chem. Rev.*, 99: 1689-1746(1999)). 또한 bDNA에 있는 염기 서열을 각각 상보적으로 결합이 가능하게 하여 bDNA간의 다이머(dimer), 트리머(trimer), 테트라머(tetramer)가 이루는 독특한 구조를 분석하는 것도 당분야에서 학문적으로 흥미있는 주제이다. 따라서, 4개의 히드록시기를 갖고 있는 펜타에리트리톨을 출발물질로 사용하여 bDNA를 만들기 위한 다양한 포스포라미다이트(화합물 2)를 합성할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 합성을 위해 가장 널리 사용되는 보호기인 DMTr 기로 보호반응을 수행하여 하나, 두 개, 그리고 세 개의 DMTr 기가 보호된 반응 산물을 얻을 수 있으며, 얻어진 산물 중 DMTr 기가 3개 도입된 화합물(화합물 11)의 나머지 히드록시기에 포스포라미다이트기를 도입하여 ODN 합성을 위한 포스포라미다이트(화합물 7)를 합성할 수 있고, DMTr기가 2개 도입된 화합물(화합물 12)에 새로운 보호기로 Lev(levuliny)기를 도입하여 화합물(화합물 14)을 얻은 후 나머지 히드록시기에 포스포라미다이트 기를 도입하여 ODN 합성을 위한 포스포라미다이트(화합물 9)를 합성할 수 있다. 또한, 하나의 DMTr기가 도입된 화합물(화합물 13)에 Lev기를 도입하는 과정에서 2 개의 lev가 도입된 부산물(화합물 15)을 얻고, 이 화합물에 포스포라미다이트기를 도입하여 ODN 합성을 위한 포스포라미다이트(화합물 8)을 합성할 수 있으며, DMTr기와 lev기를 각각 하나씩 갖는 화합물(화합물 16)에 TBDMS(*tert*-butyldimethylsilyl)기를 도입하고(화합물 17) 포스포라미다이트기를 도입하여 ODN 합성을 위한 포스포라미다이트(화합물 10)를 수득할 수 있다.

<35> 얻어진 화합물은 합성기를 이용한 덴드리머(dendrimer)의 합성 및 bDNA의 합성을 위해 이용할 수 있다. 특히, 서로 다른 염기서열을 갖는 bDNA를 합성하는데 이용이 가능하며, bDNA를 합성한 후 DNA 나노 구조의 형성을 위해서도 적용 가능하다.

<36> 【반응식 4】



<37> 【화학식 2】



<38> 이하 하기 실시예에 의하여 본 발명을 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<39> 실시예 1 : (R)-(-) 또는 (S)-(+)-1,3-부탄디올을 이용한 포스포라미다이트의 제조

<40> (단계 1) S-(+)-1-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-1,3-부탄디올의 제조

<41> S-(+)-1,3-부탄디올 (96 mg, 1.065 mmol)을 3ml의 피리딘에 녹인 후, 빙수욕 중에서 0℃로 냉각한 후 4,4'-디메톡시트리틸 클로라이드 (430 mg, 1.27 mmol)를 첨가하였다. 빙수욕을 제거하여 상온으로 만들고 6시간 동안 교반하였다. 여기에 5% NaHCO₃ 용액 (10 ml)을 넣은 후 에틸 아세테이트 (15 ml)로 추출하였다. 유기 용매 층을 MgSO₄으로 건조한 후, 감압 증류하였다. 얻어진 노란색 액체를 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피(에틸 아세테이트:헥산=1:3)로 정제하여 표제 화합물 (401 mg, 1.02 mmol)을 96% 수율로 수득하였다: R_f = 0.3 (에틸 아세테이트:헥산=1:2); IR (NaCl) ν (cm⁻¹) 3462, 3059, 3034, 2959, 2927, 2848, 2835, 1607, 1508, 1250; ¹H NMR (아세톤-d₆) δ 7.49 (br, 1H), 7.46 (br, 1H), 7.36-7.18 (m, 7H), 6.86 (t, 2H, J=2.6Hz), 6.84 (t, 2H, J=2.6Hz), 3.93 (br, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.50 (br, 1H), 3.28-3.14 (m, 2H), 1.73 (m, 2H), 1.11(d, 3H, J=6.2Hz); ¹³C-NMR (75.5 MHz, 아세톤-d₆) δ 158.1, 145.3, 136.1, 136.0, 129.5, 127.6, 127.2, 126.1, 112.5, 85.4, 64.2, 60.6, 54.2, 39.0, 23.1; MS-FAB (m/z): C₂₅H₂₈O₄에 대한 [M]⁺ 계산치: 392; 실측치: 392; [α]²¹_D = +17.6 (c 1.0, CHCl₃).

<42> (단계 2) R-(-)-1-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-1,3-부탄디올의 제조

<43> R-(-)-1,3-부탄디올 (103 mg, 1.14 mmol)을 3 ml의 피리딘에 녹인 후, 빙수욕상에서 0℃로 냉각한 후 4,4'-디메톡시트리틸 클로라이드 (460 mg, 1.36 mmol)를

첨가하였다. 빙수욕을 제거하여 상온으로 만들고 6시간 동안 교반하였다. 여기에 5% NaHCO_3 용액 (10 mL)을 넣은 후 에틸 아세테이트 (15 mL)로 추출하였다. 유기 용매 층을 MgSO_4 으로 건조한 후, 감압 증류하였다. 얻어진 노란색 액체를 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (에틸 아세테이트:헥산=1:3)로 정제하여 표제 화합물 (437 mg, 1.11 mmol)을 97% 수율로 수득하였다: $R_f = 0.3$ (아세테이트:헥산=1:2); IR (NaCl) ν (cm^{-1}) 3462, 3059, 3034, 2960, 2929, 2835, 1607, 1508, 1250; ^1H NMR (아세톤- d_6) δ 7.47 (t, 1H, $J=1.7\text{Hz}$), 7.45(br, 1H), 7.35-7.20 (m, 7H), 6.87 (t, 2H, $J=2.6\text{Hz}$), 6.84 (t, 2H, $J=2.6\text{Hz}$), 3.92(br, 1H), 3.73(s, 6H), 3.47(d, 1H, $J=3.7\text{Hz}$), 3.25-3.14 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.09(d, 3H, $J=6.2\text{Hz}$); ^{13}C -NMR (75.5 MHz, 아세톤- d_6) δ 158.1, 145.2, 136.1, 136.0, 129.5, 127.6, 127.2, 126.1, 112.5, 85.4, 64.2, 60.5, 54.1, 38.9, 23.0; MS-FAB (m/z): $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_4$ 에 대한 $[\text{M}]^+$ 계산치: 392; 실측치: 392; $[\alpha]^{21}_{\text{D}} = -9.9$ (c 1.0, CHCl_3).

<44> (단계 3) 화합물 S의 제조

<45> 상기 단계 1에서 수득된 S-(+)-1-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-1,3-부탄디올 (1, 158 mg, 0.402 mmol)을 3 mL의 THF에 녹인 후, DIPEA (140 μL , 0.804 mmol)를 첨가하여 30분 동안 교반한 후 클로로-(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필아미노 포스핀 (177 μL , 0.80 mmol)을 천천히 첨가하였다. 이 때 생성되는 흰색 침전물을 여과하여 제거하고 감압 증류하였다. 이어서, 5% NaHCO_3 용액 (20 mL)을 넣은 후 CH_2Cl_2 (20 mL)로 추출한 다음, MgSO_4 으로 유기 용매 층을 감압 증류하여 수분을 제거하였

다. 얻어진 노란색 액체를 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (에틸 아세테이트:헥산=1:5)로 정제하여 무색의 표제 화합물 (203 mg, 0.34 mmol)을 85% 수율로 수득하였다; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 아세톤- d_6) δ 7.47-7.43(2H, m), 7.34-7.25 (5H, m), 7.22-7.16 (1H, m), 6.89-6.80 (4H, m), 4.15 (1H, m), 3.74 (3H, s), 3.73 (3H, s), 3.63-3.51 (3H, m), 3.20-3.16 (2H, m), 2.68 (1H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 2.55 (1H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 1.94-1.73 (3H, m), 1.21-1.11 (12H, m), 1.07 (1.5H, s), 1.05 (1.5H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, 아세톤- d_6) δ 158.1, 145.2, 136.0, 129.6, 129.5, 127.7, 127.6, 127.2, 126.1, 117.7, 117.6, 112.5, 85.4, 68.0, 67.7, 67.4, 67.2, 60.0, 59.8, 59.2, 58.1, 57.8, 57.5, 54.2, 42.4, 42.2, 38.3, 23.7, 23.6, 23.6, 23.5, 23.4, 21.6, 19.5, 19.4; $^{31}\text{P-NMR}$ (121 MHz, 아세톤- d_6) δ 149.0, 148.3; MS-FAB (m/z): $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}_1\text{Na}_1$ 에 대한 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 계산치: 615; 실측치: 615.

<46> (단계 4) 화합물 R의 제조

<47> 상기 단계 2에서 수득한 R-(-)-1-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-1,3-부탄디올 (2, 138 mg, 0.315 mmol)을 2 mL의 THF에 녹인 후, DIPEA (140 μL , 0.804 mmol)를 첨가한 다음, 30분 동안 교반한 후 클로로-(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필아미노 포

스핀 (157 μ l, 0.70 mmol)을 천천히 첨가하였다. 이 때 생성되는 흰색 침전물을 여과하여 제거하고 감압증류하였다. 5% NaHCO_3 용액 (10 ml)을 넣은 후 CH_2Cl_2 (15 ml)로 추출한 다음, MgSO_4 으로 유기용매 층을 감압증류하여 수분을 제거하였다. 수득된 노란색 액체를 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (에틸 아세테이트:헥산=1:5)로 정제하여 무색의 표제 화합물 (108 mg, 0.182 mmol)을 52% 수율로 수득하였다; R_f = 0.45 (에틸 아세테이트:헥산=1:5) ^1H -NMR (300MHz, 아세톤- d_6) δ 7.47-7.43 (2H, m), 7.34-7.25 (5H, m), 7.22-7.16 (1H, m), 6.89-6.80 (4H, m), 4.15 (1H, m), 3.76 (3H, s), 3.75 (3H, s), 3.63-3.51 (3H, m), 3.20-3.16 (2H, m), 2.68 (1H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 2.55 (1H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 1.94-1.73 (3H, m), 1.19-1.10 (12H, m), 1.05 (1.5H, s), 1.03 (1.5H, s); ^{13}C -NMR (75.5 MHz, 아세톤- d_6) δ 158.1, 145.2, 136.0, 129.5, 129.5, 127.6, 127.5, 127.2, 126.1, 117.6, 112.4, 85.3, 67.9, 67.7, 67.4, 67.2, 66.7, 59.9, 59.8, 58.0, 57.8, 57.5, 54.1, 42.4, 42.2, 38.3, 38.2, 24.8, 23.7, 23.6, 23.5, 23.4, 23.3, 21.6, 19.4, 19.3; ^{31}P -NMR (121 MHz, 아세톤- d_6) δ 149.0, 148.3; MS-FAB (m/z): $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}_1\text{Na}_1$ 에 대한 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 계산치: 615; 실측치: 615.

<48> 시험예 1

<49> 상기 실시예 1에서 제조된 두 개의 거울상 이성질체를 임의의 올리고뉴클레오타이드의 내부에 삽입하여 하기와 같은 방법으로 가장 작은 단위의 키랄 중심체의 차이가 전체의 올리고뉴클레오타이드의 구조에 미치는 영향을 관찰하였다. 이 때 올리고데옥시리보뉴클레오타이드는 급속 헥산 합성기 8900 (Expedite Nucleic Acid Synthesis System 8090)에 상기 포스포라미다이트 화합물을 넣어 합성 하였다.

<50> 합성된 ODNs의 염기 서열과 Maldi-Tof mass를 이용하여 분자량을 확인하였다 (3-하이드록실피콜린산을 매트릭스로 사용; 25000V; 극성: 양성). 그 결과를 요약하면, 서열번호: 1의 올리고 1: 계산치 3425.3, 실측치 3433.3; 서열번호: 2의 올리고 2: 계산치 3425.3, 실측치 3462.3; 서열번호: 3의 올리고 3: 계산치 3528.7, 실측치 3534.5; 서열번호: 4의 올리고 4: 계산치 3528.7; 실측치 3538.6; 서열번호: 5의 올리고 5: 계산치 3577.4; 실측치 3594.0; 서열번호: 6의 올리고 6: 계산치 3274.2, 실측치 3277.6; 서열번호: 7의 올리고 7: 계산치 3690.2, 실측치 3701.0; 서열번호: 8의 올리고 8: 계산치 3377.6, 실측치 3384.1; 서열번호: 9의 올리고 9: 계산치 3786.0, 실측치 3794.0; 서열번호: 10의 올리고 10: 계산치 3786.1, 실측치 3794.9; 서열번호: 11의 올리고 11: 계산치 3947.6, 실측치 3950.7; 서열번호: 12의 올리고 12: 계산치 3938.2, 실측치 3944.7; 서열번호: 13의 올리고 13: 계산치 3963.2, 실측치 3969.1; 서열번호: 14의 올리고 14: 계산치 3923.2, 실측치 3925.9 이었다.

<51> 또한, 상기 ODNs로부터 표 1에 기재된 바와 같은 조합에 의해 제조된 이중체 (duplex)의 용융온도(melting temperature, T_m)를 확인하기 위해, 100 mM NaCl 및 20 mM $MgCl_2$ 를 함유하는 트리스-HCl 완충액(10 mM, pH 7.2)에서 1.0 °C/분의 비율로 온도를 증가시키면서 이중체의 흡광도(260 nm) 변화를 측정하여 하기 표 1 및 도 1에 나타내었다. 여기에서, 이중체 1, 2, 9는 총 농도를 4.0 μM 로, 이중체 3 내지 8 및 10은 총 농도를 6.6 μM 로 조정하여 실험하였다.

<52>

【표 1】

	이중체(Duplex)	서열	T _m (℃)	ΔT _m (℃)
1	Oligo 1 / Oligo 7	5d-T ₆ Rp T ₅ / 5d-A ₁₂	26	-12
2	Oligo 2 / Oligo 7	5d-T ₆ Sp T ₅ / 5d-A ₁₂	26	-12
3	Oligo 3 / Oligo 5	5d-A ₅ Rp A ₆ / 5d-T ₁₂	28	-10
4	Oligo 4 / Oligo 5	5d-A ₅ Sp A ₆ / 5d-T ₁₂	27	-11
5	Oligo 1 / Oligo 3	5d-T ₆ Rp T ₅ / 5d-A ₅ Rp	15	-23
6	Oligo 1 / Oligo 4	5d-T ₆ Rp T ₅ ⁶ / 5d-A ₅ Sp	14	-24
7	Oligo 2 / Oligo 3	5d-T ₆ Sp T ₅ ⁶ / 5d-A ₅ Rp	15	-23
8	Oligo 2 / Oligo 4	5d-T ₆ Sp T ₅ ⁶ / 5d-A ₅ Sp	15	-23
9	Oligo 5 / Oligo 7	5d-T ₁₂ A ₆ / 5d-A ₁₂	38	0
10	Oligo 6 / Oligo 8	5d-T ₁₁ / 5d-A ₁₁	35	-3

<53> 여기에서 보듯이, 올리고 1과 A₁₂로 이루어진 이중체 및 올리고 2와 A₁₂로 이루어진 이중체의 T_m은 T₁₂와 A₁₂로 이루어진 이중체의 T_m 보다 12℃ 낮은 값을 가짐을 알 수 있다. 이는 1,3-부탄디올이 수소 결합할 수 있는 염기가 없고, 당고리 보다 유연하기 때문에 낮은 T_m을 갖는 것으로 보인다. 이로부터 알 수 있는 중요한 사실은 올리고 1과 올리고 2가 같은 T_m을 갖는다는 것이다.

<54> 또한, 각 올리고머의 CD (circular dichroism) 스펙트럼을 측정하여 상기 표 1, 도 2 및 3에 나타내었고, HPLC(조건: 상온, Agilent Eclipse XDB-C18 칼럼, 4.6x150 mm, 5 μ, 80Å 공극 크기, 용매조건: 시료 주입 후, 5% 아세토니트릴/0.1M 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA) pH 7.0를 10분동안 흘려준 후, 10분 동안 50% 아세토니트릴/0.1M TEAA로 선형적으로 증가시킨 다음 5분간 유지시키고, 선형적으로 감소시켜 초기 상태로 한다. 용매는 1분당 1ml을 흘려주었다)를 수행하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<55> 또한, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이 올리고 1(a), 올리고 2(b) 및 올리고 1과 2의 혼합물(c)이 같은 체류시간에 용출되어 R 및 S 이성질체가 거의 차이가 없음을 알 수 있다. 즉, R 및 S 이성질체는 구조적인 차이를 나타내기는 하지만 이는 전체 올리고뉴클레오타드의 구조에는 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다,

<56> 실시예 2: 벤질 글리콜레이트를 이용한 O-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-벤질글리콜레이트의 제조

<57> 벤질글리콜레이트 (100 μ l, 0.704 mmol)를 7 ml의 THF에 녹인 후, DIPEA (480 μ l, 2.8 mmol)를 첨가하였다. 30분 동안 교반한 후 클로로-(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필아미노 포스핀 (234 μ l, 1.06 mmol)을 천천히 첨가하고 30분 동안 추가로 교반하였다. 이 때 생성된 과량의 흰색 침전물을 여과하여 제거하고 용액은 감압 증류하였다. 이어서, 5% NaHCO₃ 용액(25 ml)을 넣은 후 CH₂Cl₂(40 ml)로 추출하고, MgSO₄으로 유기용매 층을 감압 증류하여 수분을 제거하였다. 얻어진 노란색 액체를 실리카 젤 칼럼 크로마토그래피 (에틸 아세테이트:헥산=1:3)로 정제하여 무색의 액체인 표제 화합물 (167 mg, 0.458 mmol)를 65% 수율로 수득하였다;

<58> MS (FAB): m/z: 389.0 [M+Na⁺]; IR (니트): ν =3032, 2967, 2932, 1758, 1496, 1455, 1395, 1185, 1098; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.33 (5H, s), 5.16 (2H, s), 4.28-4.17 (2H, m), 3.91-3.81 (2H, m), 3.64-3.57 (2H, m), 2.63-2.56 (2H, m), 1.77-1.23 (12H, m); ¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 169.8, 169.8, 134.9, 128.1, 128.0, 117.3, 66.3, 60.4, 60.1, 58.6, 58.4, 42.9, 42.7, 24.2, 24.1, 24.0, 19.8,

19.8; ^{31}P -NMR (121 MHz, CDCl_3) δ 153.7; HRMS-FAB (m/z): $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}_1\text{Na}_1$ 에 대한 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 계산치: 389.1606; 실측치: 368.1603.

<59> 실시예 3: 리토콜산(lithocolic acid)을 이용한 포스포라미다이트의 제조

<60> (단계 1) 리토콜 알콜(화합물 4)의 제조

<61> 리토콜산 (527 mg, 1.40 mmol) 을 30 ml의 THF에 녹이고, 0℃로 냉각한 다음 LAH(Lithium aluminum hydride) (247.6 mg, 6.58 mmol)를 첨가하여 4시간 동안 교반한 후 250 μl H_2O 를 넣고, 15% NaOH 수용액 (250 μl)을 첨가하였다. 750 μl 의 H_2O 를 추가로 넣어 주면 흰색 고체가 과량으로 생성되는데, 이를 여과하여 제거하고 감압증류하여 흰색의 고체인 표제 화합물 (486.4 mg, 1.33 mmol)을 95% 수율로 수득하였다:

<62> m.p. 96.5-97.8℃;

<63> MS (EI): m/z : 362.3 [M^+];

<64> IR (니트): $\nu=3205, 2934, 2862, 1446, 1066, 914, 728\text{cm}^{-1}$; ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3) $\delta=3.61\text{--}3.57$ (3H, m), 1.82-1.01 (28H, m), 0.90 (6H, s), 0.62 (3H, s); ^{13}C -NMR (75.5MHz, CDCl_3) δ 70.3, 62.0, 56.0, 55.7, 42.1, 41.6, 35.9, 35.3, 35.1, 35.0, 34.1, 31.5, 30.0, 29.0, 27.8, 26.8, 26.0, 23.7, 23.0, 20.3, 18.2, 11.6; HRMS-FAB (m/z): $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{O}_1$ 에 대한 $[\text{M}-\text{OH}]^+$ 계산치: 345.3157; 실측치: 345.20.

<65> (단계 2) O-DMTr-리토콜 알콜(화합물 5)의 제조

<66> 단계 1에서 수득한 화합물 4 (455.1 mg, 1.25 mmol)과 DMAP (68 mg, 0.06 mmol)이 녹아 있는 피리딘 (10 ml) 용액에 DMTr-Cl (544 mg, 1.63 mmol)을 첨가하였다. 상온에서 19 시간 동안 교반한 후, 피리딘을 감압 증류하였다. 5% NaHCO₃(50 ml)을 넣어 준 후 에틸 아세테이트(50 ml)로 추출한 후, 유기층을 MgSO₄로 건조하고 감압증류하여 오렌지색 오일을 얻었다. 이를 플fp시 크로마토그래피(flash chromatography) (EA/Hex=1:4)로 정제하여 흰색 고체인 표제 화합물 (744.8 mg, 1.12 mmol)을 89% 수율로 수득하였다.

<67> m.p. 81.2-82.1℃;

<68> MS (FAB): m/z: 664.4 (M⁺); IR (니트): ν =3421, 2934, 2863, 1739, 1608, 1582, 1509, 1446, 1250, 1175, 1036, 827cm⁻¹; ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ =7.45 (d, 2H, J=7.2Hz), 7.35-7.26 (m, 7H), 6.89-6.80 (dd, 4H, J₁=7.0Hz, J₂=1.9Hz), 3.80 (s, 6H), 3.64 (br, 1H), 3.04-2.98 (m, 2H), 1.99-0.89 (m, 34H), 0.63 (s, 3H); ¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ =159.0, 148.2, 137.6, 130.7, 129.0, 128.3, 127.2, 126.6, 113.7, 86.4, 72.6, 64.7, 57.3, 56.9, 55.9, 43.4, 42.9, 41.2, 40.9, 37.2, 36.6, 36.3, 36.1, 35.3, 33.1, 31.3, 28.9, 27.9, 27.4, 27.2, 24.9, 24.1, 21.6, 19.4, 12.8; HRMS-FAB (m/z): C₄₅H₆₀O₄에 대한 [M-OH]⁺ 계산치: 664.4492; 실측치: 664.4489.

<69> (단계 3) O-DMTr-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-리토콜 알콜(화합물 6)의 제조

<70> 단계 2에서 수득한 화합물 5 (89.2 mg, 0.15 mmol)와 DIPEA (77 μ l, 0.45 mmol)을 CH₂Cl₂ (2 ml)에 녹인 후 클로로-(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스핀 (49 μ l,

0.225 mmol)을 천천히 첨가하였고, 온상에서 15분 동안 교반하였다. 이어서, 5% NaHCO_3 (10 mL)을 CH_2Cl_2 (10 mL)로 추출하였다. 유기층을 MgSO_4 로 건조하고 감압 증류하여 흰색 고체를 얻었다. 이를 플래시 크로마토그래피(용출액: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Hex}=1:1.5$)로 정제하여 흰색의 고체인 표제 화합물(69.3 mg, 0.081 mmol)을 54% 수율로 수득하였다:

<71> MS (FAB): m/z : 866 $[\text{M}+\text{H}^+]$; IR (니트): $\nu=3353, 2962, 2935, 2866, 1608, 1509, 1463, 1446, 1376, 1364, 1300, 1250, 1178, 1035, 975, 827, 754\text{cm}^{-1}$; ^1H -NMR(300MHz, CDCl_3) $\delta=7.35$ (d, 2H, $J=7.6\text{Hz}$), 7.25-7.11 (m, 7H), 6.73 (d, 4H, $J=8.7\text{Hz}$), 3.70 (s, 9H), 3.52 (m, 2H), 2.91 (m, 2H), 2.65 (t, 2H, $J=6.4\text{Hz}$), 1.88-0.80 (m, 46H), 0.53 (s, 3H); ^{13}C -NMR (75.5MHz, CDCl_3) $\delta=159.0, 146.2, 137.6, 130.7, 129.0, 128.3, 127.2, 113.7, 110.1, 86.4, 77.9, 75.2, 74.9, 64.7, 59.1, 58.8, 57.2, 56.9, 55.9, 43.8, 43.7, 43.4, 43.0, 41.1, 40.9, 36.6, 36.2, 36.0, 35.3, 33.1, 32.3, 30.3, 28.9, 28.0, 27.4, 27.1, 25.4, 25.3, 25.2, 25.1, 24.9, 24.0, 21.5, 21.1, 21.0, 19.4, 12.7$; ^{31}P -NMR (121 MHz, CDCl_3) $\delta=148.1, 147.4$; HRMS-FAB (m/z): $\text{C}_{54}\text{H}_{78}\text{O}_5\text{N}_2\text{P}_1$ 에 대한 $[\text{M}+1]^+$ 계산치: 865.5648; 실측치: 865.5641.

<72> 실시예 4: bDNA의 합성을 위한 포스포라미다이트 (화합물 7)의 제조

<73> (단계 1) 펜타에리트리톨의 DMTr 보호반응 (화합물 11, 12 및 13의 합성)

<74> 펜타에리트리톨 (1.1 g, 7.34 mmol) 및 DMAP(4-dimethylaminopyridine) (276 mg, 2.26 mmol)가 녹아 있는 Py/DMF (2/1, 15 mL) 용액에 DMTr-Cl (4.1 g, 12.1 mmol)을 첨가하였다. 상온에서 10 시간 동안 교반한 다음, 5% NaHCO_3 (80 mL)을 넣어준 후 CH_2Cl_2

(50 ml)로 추출하였다. 유기층을 MgSO_4 로 건조하고 감압 증류하여 오렌지색 오일을 수득하였다. 이를 플래시 크로마토그래피(용출액: 에틸 아세테이트:헥산=1:2에서 화합물 11을 얻고, 에틸 아세테이트:헥산=1:1에서 화합물 12를 분리한 후, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=10:1$ 로 화합물 13을 얻음)로 정제하여 세가지 반응 산물(화합물 11: 2.93 g, 2.81 mmol, 70%; 화합물 12: 520 mg, 0.702 mmol, 11.6 %; 화합물 13: 395 mg, 0.901 mmol, 7.4 %)을 수득하였다:

- <75> 화합물 11: m.p. 96.3–97.8°C; MS (FAB): m/z : 1065.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$); IR (니트): $\nu=3410.1, 2929.6, 1607.4, 1508.1, 1461.7, 1300.2, 1250.6, 1176.4, 1034.3 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): $\delta=7.26\text{--}7.24$ (m, 6H), 7.19–7.15 (m, 21H), 6.72 (d, 12H, $J=8.9\text{Hz}$), 3.76 (s, 18H), 3.59 (s, 2H), 3.32 (s, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta=158.8, 145.3, 136.3, 130.6, 128.6, 128.1, 126.9, 113.4, 86.4, 64.3, 55.5, 45.8$.
- <76> 화합물 12: m.p. 88.8–89.7°C. MS (FAB): m/z : 763.2 ($\text{M}+\text{Na}^+$); IR (니트): $\nu=3442, 1684, 1652, 1608, 1507, 1457, 1250, 1217, 1176, 1034\text{cm}^{-1}$, $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): $\delta=7.38\text{--}7.36$ (m, 4H), 7.29–7.20 (m, 14H), 6.80 (4, 8H, $J=8.5\text{Hz}$), 3.76 (s, 12H), 3.64 (s, 4H), 3.23 (s, 4H), 2.39 (s, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5MHz, CDCl_3): $\delta=158.0, 144.3, 135.3, 129.7, 127.7, 127.4, 126.3, 112.7, 85.8, 65.0, 62.7, 54.7, 45.0$; HRMS-FAB (m/z): $\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{O}_{10}\text{Na}$ 에 대한 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 계산치: 763.3247; 실측치: 763.3247.
- <77> 화합물 13: 실온에서 오일상의 화합물; MS (FAB): m/z : 461.1 ($\text{M}+\text{Na}^+$); IR (니트): $\nu = 3734.1, 3404.7, 2927.3, 1733.7, 1607.2, 1540.8, 1508.1, 1458.0, 1300.8,$

1250.1, 1176.1, 1033.3, 828.9, 754.7 cm^{-1} , $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ =7.40-7.39 (m, 2H), 7.31-7.24 (m, 7H), 6.84-6.81 (m, 4H), 3.77 (s, 6H), 3.71 (s, 6H), 3.16 (s, 2H), 2.35 (br, 2H), 1.63 (br, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5MHz, CDCl_3): δ =158.8, 135.7, 130.2, 128.2, 127.2, 113.5, 65.4, 64.1, 55.4, 45.5.

<78> (단계 2) O-트리-DMTr-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-펜타에리트리톨 (7)의 제조

<79> 화합물 11 (560 mg, 0.537 mmol)과 DIPEA (187 μl , 1.074 mmol)을 THF (6 ml)에 녹인 후 클로로-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스핀 (297 μl , 1.34 mmol)을 천천히 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. 5% NaHCO_3 (10ml)을 넣어 준 후 에틸 아세테이트(10ml)로 추출하였다. 유기층을 MgSO_4 로 건조하고 감압 증류하여 노란색 오일을 수득하였다. 이를 플래시 크로마토그래피(용출액: 에틸 아세테이트:헥산=1:3)로 정제하여 무색의 오일의 표제 화합물 (236 mg, 0.190 mmol, 35 %)을 수득하였다:

<80> MS (FAB): m/z : 1265.6 $[\text{M}+\text{Na}^+]$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =7.27-7.14 (m, 27H), 6.72-6.68 (m, 12H), 4.11 (q, 2H, $J=6.7\text{Hz}$), 3.75 (s, 18H), 3.39-3.23 (m, 8H), 2.23 (t, 2H, $J=6.3\text{Hz}$), 2.03 (s, 2H), 1.31-1.22 (m, 4H), 1.09 (d, 6H, $J=6.7\text{Hz}$), 0.95 (d, 6H, $J=6.7\text{Hz}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ =157.7, 144.7, 135.8, 129.7, 127.8, 127.1, 126.0, 112.5, 85.1, 62.3, 57.7, 54.7, 42.5, 24.1, 24.0, 13.7; $^{31}\text{P-NMR}$ (121.5 MHz, CDCl_3): δ =148.9; HRMS-ESI (m/z): $\text{C}_{77}\text{H}_{83}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P}_1\text{Na}_1$ 에 대한 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 계산치: 1243.5852; 실측치: 1243.5807.

<81> 실시예 5: bDNA의 합성을 위한 포스포라미다이트 (화합물 8)의 제조

<82> (단계 1) O-DMTr-O-Lev-펜타에리트리톨 (화합물 15) 및 O-DMTr-O-di-Lev-펜타에리트리톨 (화합물 16)의 제조

<83> 상기 실시예 4의 (단계 1)에서 수득된 화합물 13 (484.3 mg, 1.10 mmol), EDC (253 mg, 1.32 mmol), 및 DMAP (162 mg, 1.32 mmol)이 녹아 있는 MC 용액 10 ml에 루블린산 (135 mg, 1.32 mmol)을 첨가하였다. 상온에서 3시간 동안 교반한 다음, 5% NaHCO₃(20 ml)을 넣어 준 후 CH₂Cl₂(15ml)로 추출하였다. 유기층을 MgSO₄로 건조하고 감압 증류한 후 이를 플레시 크로마토그래피(조건: 에틸 아세테이트:헥산=1:2과 에틸 아세테이트:헥산=1:1로 용출)로 정제하여 노란색 액체인 표제 화합물 (화합물 15: 141 mg, 0.22 mmol, 20%; 화합물 16: 285 mg, 0.53 mmol, 48%)을 수득하였다:

<84> 화합물 15: MS (FAB): m/z 657,2 (M+Na⁺); IR (니트): ν =3390, 1792, 1772, 1699, 1684, 1653, 1558, 1540, 1521cm⁻¹; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ =7.41-7.38 (m, 2H), 7.28-7.20 (m, 7H), 6.85-6.81 (m, 4H), 4.16-4.10 (m, 4H), 3.78 (s, 6H), 3.54 (d, 2H, J=6.8Hz), 3.14 (s, 2H), 2.69 (t, 4H, J=6.5Hz), 2.50-2.44 (m, 4H), 2.15 (s, 6H), 1.25 (t, ¹H, J=7.14Hz); ¹³C-NMR-DEPT (75.5 MHz, CDCl₃): δ =130.7 (CH₁), 128.7(CH₁), 128.5 (CH₁), 128.5 (CH₁), 113.8 (CH₁), 63.6 (CH₂), 62.6 (CH₂), 61.8 (CH₂), 55.9(CH₃), 38.6 (CH₂), 30.4 (CH₃), 28.5 (CH₂); HRMS-ESI (m/z): C₃₆H₄₂O₁₀Na에 대한 [M+Na]⁺ 계산치: 657.2676; 실측치: 657.2673.

<85> 화합물 16: MS (FAB): m/z 559.2 ($M+Na^+$); IR (니트): $\nu=3400, 3179, 3084, 3056, 3001, 2929.7, 2835.8, 1716.9, 1606.4, 1508.5, 1445.2, 1380.3, 1301.3, 1250.3, 1228.2, 1177.6, 1033.9, 996.5, 949.8, 830.4, 807.2, 754.7\text{cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): $\delta=7.38\text{--}7.35$ (m, 2H), $7.26\text{--}7.11$ (m, 7H), 6.75 (d, 4H, $J=8.5\text{Hz}$), 4.35 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.68 (s, 6H), 3.64 (s, 4H), 3.08 (s, 2H), 2.57 (t, 2H, $J=6.6\text{Hz}$), 2.37 (t, 2H, $J=6.6\text{Hz}$), 2.05 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5MHz, CDCl_3): $\delta=206.2, 172.4, 157.9, 153.8, 144.4, 135.4, 129.6, 127.6, 127.3, 126.2, 112.6, 85.5, 63.4, 63.2, 61.7, 54.6, 44.3, 29.3, 27.4$; HRMS-FAB (m/z): $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{Na}$ 에 대한 $[M+Na]^+$ 계산치: 559.2308; 실측치: 559.2308.

<86> (단계 2) O-DMTr-O-di-Lev-O-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-펜타에리트리톨 (화합물 8)의 제조

<87> 단계 1에서 수득한 화합물 15 (141 mg, 0.222 mmol)과 DIPEA (77 μl , 0.445 mmol)을 THF (6 ml)에 녹인 후 클로로-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스핀 (74 μl , 0.33 mmol)을 천천히 첨가하였다. 이어서, 상온에서 30분 동안 교반한 다음, 5% NaHCO_3 (양? 10ml)을 넣고 에틸 아세테이트(양? 10ml)로 추출하였다. 유기층을 MgSO_4 로 건조하고 감압 증류하여 노란색 오일을 수득하였다. 이를 플래시 크로마토그래피(용출액: Ethylacetate/Hexane=1:3)로 정제하여 노란색 오일인 표제 화합물 (114.2 mg, 0.1354 mmol, 61 %)을 제조하였다.

<88> MS (FAB): m/z : ($M+Na^+$); IR (니트): $\nu=2966, 2933, 1738, 1717, 1607, 1508, 1463, 1362, 1301, 1250, 1202, 1178, 1154, 1076, 1032 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta=7.40\text{--}7.38$ (m, 2H), 7.29–7.26 (m, 7H), 6.82 (d, 4H, $J=8.7\text{Hz}$), 4.17–4.12 (m, 4H), 3.78 (s, 6H), 3.73–3.65 (m, 2H), 3.61–3.51 (m, 2H), 3.15 (s, 2H), 2.68 (t, 4H, $J=6.5\text{Hz}$), 2.56 (t, 2H, $J=6.3\text{Hz}$), 2.48 (t, 4H, $J=6.5\text{Hz}$), 2.16 (s, 6H), 1.25 (d, 2H, $J=6.7\text{Hz}$), 1.16 (d, 6H, $J=6.7\text{Hz}$), 1.10 (d, 6H, $J=6.7\text{Hz}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta=205.8, 171.8, 158.0, 158.0, 144.2, 135.3, 135.0, 129.7, 127.7, 127.4, 127.3, 126.3, 117.2, 112.6, 112.5, 85.8, 85.5, 62.6, 61.6, 61.4, 60.2, 57.9, 57.7, 54.7, 46.9, 43.5, 42.7, 42.5, 37.3, 30.47, 29.3, 27.3, 24.2, 24.1, 22.1, 20.7, 19.9, 19.8$; $^{31}\text{P-NMR}$ (121.5 MHz, CDCl_3): $\delta=150.7$

<89> 실시예 6: bDNA의 합성을 위한 포스포라미다이트 (화합물 9)의 제조

<90> (단계 1) O-Di-DMTr-O-Lev-펜타에리트리톨 (화합물 14)의 제조

<91> 상기 실시예 4의 (단계 1)에서 수득한 화합물 12 (506 mg, 0.68 mmol), EDC (288 mg, 1.50 mmol), 및 DMAP (184 mg, 1.50 mmol)이 녹아 있는 CH_2Cl_2 용액 14 mL에 루블린 산 ($77 \mu\text{L}$, 0.75 mmol)을 첨가하였다. 상온에서 3 시간 동안 교반한 다음, 5% NaHCO_3 (20mL)을 넣고 CH_2Cl_2 (10mL)로 추출하였다. 유기층을 MgSO_4 로 건조하고 감압증류한 후 이를 플래시 크로마토그래피(조건: Ethylacetate/Hexane=1:2)로 정제하여 노란색 고체인 표제 화합물 (319.7 mg, 0.37 mmol, 55%)을 수득하였다:

<92> m.p. 55.4-56.1°C; MS (FAB): m/z : 861.3 ($M+Na^+$); IR (니트): $\nu=3522.7, 3055.8, 3035.1, 3000.1, 2955.5, 2932.7, 2836.1, 1733.6, 1717.2, 1506.3, 1301.6, 1251.3, 1177.6, 1154.9, 1072.5, 1033.9 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, 아세톤- d_6): $\delta=7.41-7.38$ (m, 4H), 7.29-7.18 (m, 14H), 6.85-6.82 (m, 8H), 4.15 (s, 2H), 3.77 (s, 12H), 3.77 (s, 12H), 3.69-3.67 (m, 2H), 3.50 (m, 1H), 3.29 (s, 4H), 2.63 (t, 2H, $J=6.7\text{Hz}$), 2.35 (t, 2H, $J=6.7\text{Hz}$), 2.07 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5MHz, CDCl_3): $\delta=205.7, 172.4, 159.0, 145.9, 136.4, 130.6, 128.0, 126.9, 126.3, 113.3, 86.2, 64.0, 61.9, 55.0, 45.5, 37.7, 28.0$; HRMS-FAB (m/z): $\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{O}_{10}\text{Na}$ 에 대한 $[M+Na]^+$ 계산치: 861.3615; 실측치: 861.3617.

<93> (단계 2) O-Di-DMTr-O-Lev-((2-시아노에틸)-N,N-다이소프로필-포스포라미다이트)-펜타에리트리톨 (화합물 9)의 제조

<94> 상기 (단계 1)에서 수득한 화합물 14 (319.7 mg, 0.37 mmol)와 DIPEA (260 μl , 1.48 mmol)을 THF (4 ml)에 녹인 후 클로로-(2-시아노에틸)-N,N-다이소프로필-포스핀 (166 μl , 0.74 mmol)을 천천히 첨가하였다. 상온에서 1 시간 30분 동안 교반한 다음, 5% NaHCO_3 (10ml)을 넣고 에틸 아세테이트(10ml)로 추출하였다. 유기층을 MgSO_4 로 건조하고 감압 증류하여 노란색 오일을 수득하였다. 이를 플래시 크로마토그래피(용출액: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Hexane}=3:2$)로 정제하여 노란색 오일인 표제 화합물 (302.8 mg, 0.29 mmol, 77%)을 수득하였다:

<95> MS (FAB): m/z : 1040 ($M+H^+$); IR (니트): $\nu=2964, 2931, 2932, 1736, 1720, 1607, 1581, 1508, 1463, 1444, 1250, 1177, 1032 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta=7.24$ (d, 4H, $J=7.2\text{Hz}$), 7.17-7.09 (m, 14H), 6.67 (d, 8H, $J=8.4\text{Hz}$), 4.02 (q, 2H, $J=10.7\text{Hz}$), 3.68 (s, 12H), 3.66-3.37 (m, 6H), 3.16 (m, 4H), 2.50 (t, 2H, $J=7.0\text{Hz}$), 2.35 (t, 2H, $J=6.3\text{Hz}$), 2.28 (t, 2H, $J=6.7\text{Hz}$), 2.05 (s, 3H), 1.21 (t, 4H, $J=5.7\text{Hz}$), 1.05 (d, 6H, $J=6.7\text{Hz}$), 0.94 (d, 6H, $J=6.7\text{Hz}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta=172.5, 158.8, 145.2, 136.2, 130.5, 128.4, 127.9, 126.8, 117.9, 113.2, 86.0, 61.6, 60.6, 55.4, 43.3, 43.1, 38.0, 30.0, 28.0, 24.8, 24.7, 14.4, 158.0, 144.2, 135.3, 135.0, 129.7, 127.7, 127.4, 127.3, 126.3, 117.2, 112.6, 112.5, 85.8, 85.5, 62.6, 61.6, 61.4, 60.2, 57.9, 57.7, 54.7, 46.9, 43.5, 42.7, 42.5, 37.3, 30.47, 29.3, 27.3, 24.2, 24.1, 22.1, 20.7, 19.9, 19.8$; $^{31}\text{P-NMR}$ (121.5 MHz, CDCl_3): $\delta=150.2$; HRMS-FAB (m/z): $\text{C}_{61}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P}_1\text{Na}_1$ 에 대한 $[M+H]^+$ 계산치: 1039.4874; 실측치: 1039.4877.

<96> 실시예 7: bDNA의 합성을 위한 포스포라미다이트 (화합물 10)의 제조

<97> (단계 1) O-DMTr-O-Lev-O-TBDMS-펜타에리트리톨 (화합물 17)의 제조

<98> 상기 실시예 6의 (단계 1)에서 수득한 화합물 16 (213 mg, 0.40 mmol)과 DMAP (164 mg, 1.33 mmol)가 녹아 있는 THF (4 ml) 용액에 tert-부틸디메틸실릴 클로라이드 (65 mg, 0.44 mmol)를 첨가하였다. 상온에서 3 시간 동안 교반한 다음, 5% NaHCO_3 (10ml)을 넣어 준 후 CH_2Cl_2 (20ml)로 추출하였다. 유기층을 MgSO_4 로 건조하고 감압 증류한 후

이를 크로마토그래피(Ethylacetate/Hexane=1:2)로 정제하여 노란색 액체인 표제 화합물 (119 mg, 0.18 mmol, 46%; Di-보호된 산물: 72.8 mg, 0.1 mmol, 25%)을 수득하였다:

<99> MS (FAB): m/z 673.3 ($M+Na^+$); IR (니트): $\nu=3500.5, 2953.9, 2930.1, 2855.9, 1720.0, 1608.1, 1509.0, 1463.7, 1444.9, 1359.5, 1301.4, 1251.4, 1177.4, 1157.6, 1071.9, 1035.4, 911.9, 836.1 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): $\delta=7.43\text{--}7.41$ (m, 2H), $7.32\text{--}7.26$ (m, 7H), $6.85\text{--}6.82$ (m, 4H), 4.20 (d, 2H, $J=4.0\text{Hz}$), 3.79 (s, 6H), $3.66\text{--}3.64$ (m, 4H), 3.15 (s, 2H), 2.70 (t, 2H, $J=6.6\text{Hz}$), 2.50 (t, 2H, $J=6.5\text{Hz}$), 2.17 (s, 3H), 0.84 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), 0.02 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5MHz, CDCl_3): $\delta=206.6, 173.0, 158.9, 145.1, 136.2, 130.5, 128.5, 128.2, 127.2, 113.5, 86.6, 64.8, 64.0, 63.9, 62.6, 55.6, 45.5, 38.3, 30.1, 28.3, 26.2, 18.5, -5.3$; HRMS-FAB (m/z): $[M+Na]^+$ 계산치: 673.3173; 실측치: 673.3173.

<100> (단계 2) O-DMTr-O-Lev-O-TBDMS-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-펜타에리트리톨 (화합물 10)의 제조

<101> 단계 1에서 수득한 화합물 17 (134.8 mg, 0.207 mmol)과 DIPEA (144 μl , 0.828 mmol)을 THF (4.2 ml)에 녹인 후 클로로-(2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스핀 (114 μl , 0.518 mmol)을 천천히 첨가하였다. 상온에서 1시간 30분 동안 교반한 다음, 5% NaHCO_3 (10 ml)을 넣어 준 후 에틸 아세테이트(10 ml)로 추출하였다. 유기층을 MgSO_4 로 건조하고 감압 증류하여 노란색 오일을 수득하였다. 이를 플래시 크로마토그래피(에틸

아세테이트/헥산=1:3)로 정제하여 노란색 오일인 표제 화합물 (86.2 mg, 0.101 mmol, 50%)을 수득하였다:

<102> MS (FAB): m/z : 873.33 ($M+Na^+$); IR(니트): ν =2961.8, 2930.2, 2881.8, 2856.3, 1738.0, 1721.9, 1607.7, 1508.9, 1463.6, 1445.3, 1362.9, 1279.9, 1251.5, 1178.0 cm^{-1} ; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ =7.41-7.38 (m, 2H), 7.29-7.17 (m, 7H), 6.79 (d, 4H, J =8.9Hz), 4.11-4.09 (m, 2H), 3.76 (s, 6H), 3.70-3.52 (m, 8H), 3.12 (s, 2H), 2.66-2.64 (m, 2H), 2.53-2.45 (m, 4H), 2.15 (s, 3H), 1.14 (d, 6H, J =6.8Hz), 1.08 (dd, 6H, J_1 =6.7Hz, J_2 =1.4Hz), 0.08 (d, 9H, J = 1.1Hz), -0.03 (d, 6H, J =2.4Hz); ^{13}C -NMR(75.5 MHz, $CDCl_3$): δ =205.9, 171.9, 157.9, 144.6, 135.7, 129.7, 127.2, 126.1, 117.2, 112.5, 85.3, 63.2, 61.0, 60.4, 57.7, 54.7, 45.0, 42.6, 42.5, 37.4, 29.4, 27.3, 25.3, 24.2, 24.1, 19.9, 19.8, 17.7, -6.12; ^{31}P -NMR (121.5 MHz, $CDCl_3$): δ =150.3, 150.1; HRMS-FAB (m/z): $C_{46}H_{67}N_2O_9P_1Si_1Na_1$ 에 대한 $[M+Na]^+$ 계산치: 873.4251; 실측치: 873.4252.

【발명의 효과】

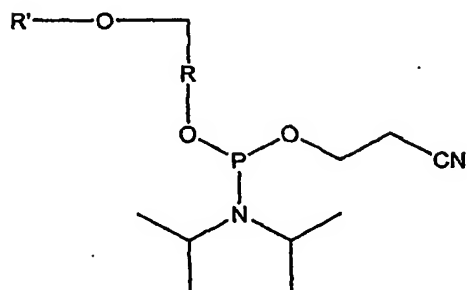
<103> 이와 같이 본 발명에서 수득된 포스포라미다이트 화합물은 여러 가지 목적의 올리고데옥시리보뉴클레오타이드의 합성을 위한 새로운 빌딩블록으로서 의약 및 생명과학 분야, 즉, 비극성(hydrophobic) 리토콜 알콜을 도입하여 세포투과도를 증가시킨 유전자약, 다양한 염기서열이 도입된 ODN 덴드리머를 합성하여 고효율의 진단도구 개발, 다양한 나노 구조의 ODN 합성 등에 적용시킬 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 화학식 1의 포스포라미다이트 화합물:

화학식 1



상기 식에서, R은 1,3-부탄디올, 펜타에리트리톨 또는 리토콜 알콜이고,

R'는 DMTr, Lev, TBDMS 또는 벤질기이다.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

(S)-(+)-1-O-DMT-3-O-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-1,3-부탄디올, (R)-(-)-1-O-DMT-3-O-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-1,3-부탄디올, O-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-벤질글리콜레이트, O-DMTr-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-리토콜 알콜, O-트리-DMTr-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-펜타에리트리톨, O-DMTr-O-di-Lev-O-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-펜타에리트리



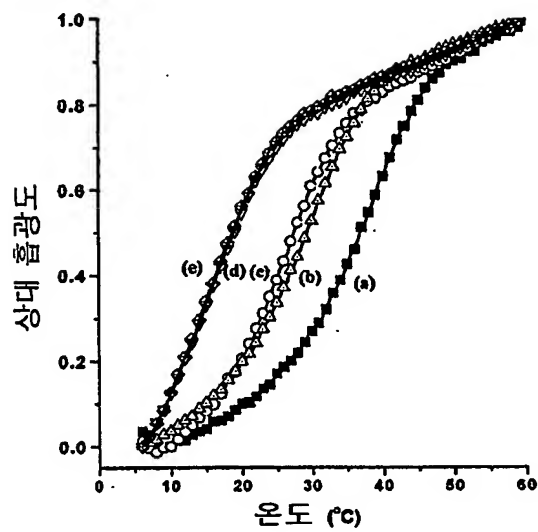
1020030001392

출력 일자: 2003/4/23

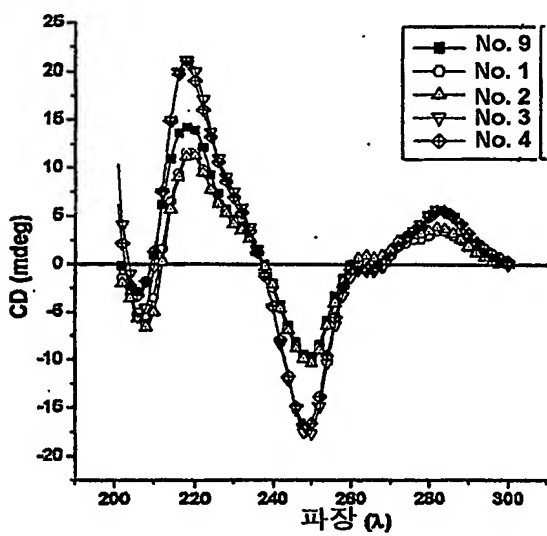
톨 또는 0-DMTr-O-Lev-O-TBDMS-((2-시아노에틸)-N,N-디이소프로필-포스포라미다이트)-펜
타에리트리톨인 포스포라미다이트 화합물.

【도면】

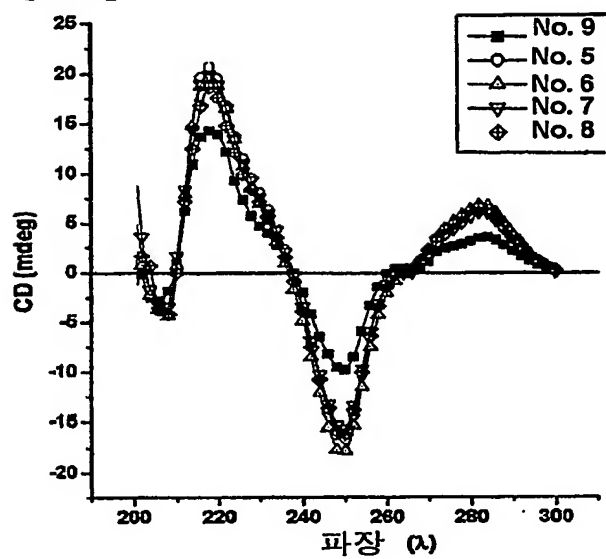
【도 1】



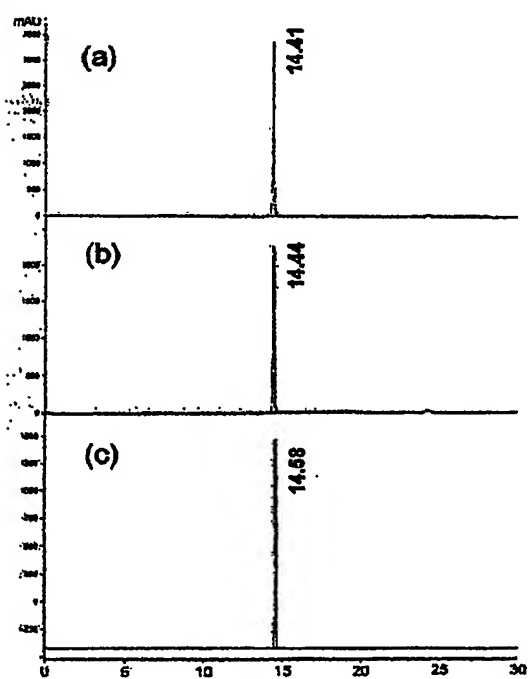
【도 2】



【도 3】



【도 4】



【서열목록】

<110> POSTECH FOUNDATION <120>

PHOSPHORAMIDITE COMPOUNDS <130>

FPD/200210-0049 <160>

14 <170>

KopatentIn 1.71 <210>

1 <211>

12 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligo 1 <220> <221>
 modified_base <222> (7) <223> n is (R)-phosphoramidite compound <400> 1
 ttttttnttt tt 12 <210>
 2 <211> 12 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligo 2
 <220> <221> modified_base <222> (7) <223> n is (S)-phosphoramidite compound
 <400> 2 ttttttnttt tt
 12 <210> 3 <211> 12 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 oligo 3 <220> <221> modified_base <222> (6) <223> n is (R)-phosphoramidite
 compound <400> 3 aaaaanaaaa aa
 12 <210> 4 <211> 12 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 oligo 4 <220> <221> modified_base <222> (6) <223> n is (S)-phosphoramidite
 compound <400> 4 aaaaanaaaa aa
 12 <210> 5 <211> 12 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 oligo 5 <400> 5 tttttttttt tt
 12 <210> 6 <211> 11 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 oligo 6 <400> 6 tttttttttt t
 11 <210> 7 <211> 12 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 oligo 7 <400> 7 aaaaaaaaaa aa
 12 <210> 8 <211> 11 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 oligo 8 <400> 8 aaaaaaaaaa a
 11 <210> 9 <211> 13 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

oligo 9 <220> <221> modified_base <222> (7) <223> n is (R)-phosphoramidite
compound <400> 9 aacgttnaac gtt

13 <210> 10 <211> 13 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

oligo 10 <220> <221> modified_base <222> (7) <223> n is (S)-phosphoramidite
compound <400> 10 aacgttnaac gtt

13 <210> 11 <211> 13 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

oligo 11 <400> 11 aacgttaaac gtt

13 <210> 12 <211> 13 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

oligo 12 <400> 12 aacgtttaac gtt

13 <210> 13 <211> 13 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

oligo 13 <400> 13 aacgttgaac gtt

13 <210> 14 <211> 13 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

oligo 14 <400> 14 aacgttcaac gtt